

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
5. Dezember 2002 (05.12.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 02/096468 A2**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: **A61K 48/00**,  
A61P 13/12, G01N 33/53

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE02/01999

(22) Internationales Anmeldedatum:  
30. Mai 2002 (30.05.2002)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
101 26 473.9 31. Mai 2001 (31.05.2001) DE

(71) Anmelder und

(72) Erfinder: **DANIEL, Peter** [DE/DE]; Treiberpfad 14,  
13469 Berlin (DE).

(71) Anmelder und

(72) Erfinder (nur für US): **GILLISSEN, Bernhard** [DE/DE];  
Grossbeerenstr. 36, 10965 Berlin (DE).

(74) Anwalt: **BAUMBACH, F.**; Robert-Rössle-Strasse 10,  
13125 Berlin (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Veröffentlicht:**

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD FOR THE DIAGNOSIS AND THERAPY OF RENAL CELL CARCINOMA

(54) Bezeichnung: METHODE ZUR DIAGNOSE UND THERAPIE DES NIERENZELLKARZINOMS

(57) Abstract: The invention relates to a novel agent for the diagnosis and therapy of renal cell carcinoma and other renal tumors, for example, Wilms' tumor or other tumors not originating from the kidneys. The areas of applications of the invention include the field of medicine and the pharmaceutical industry. The aim of the invention is to provide novel forms of treatment, which are urgently required in the present-day processing state, as well as novel diagnostic agents for renal cell carcinoma. It was surprisingly discovered that the NBK protein, which is highly expressed in normal renal tissue, is not expressed at all or is only weakly expressed in the tumor tissue. The protein expression and the loss of NBK was examined in 80 renal cell carcinoma samples by using immunohistochemistry and mutation analysis. The inventive method for diagnosis is characterized in that the NBK protein concentration or the NBK-RNA quantity in the tissue is determined. The inventive agent for the therapy of the renal cell carcinoma and other renal tumors is characterized in that the NBK protein concentration in renal cell or in other tissues is increased and directly initiates the therapeutic effect in these cells.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein neues Mittel zur Diagnose und Therapie des Nierenzellkarzinoms, sowie anderer Nierentumore, beispielsweise des Wilms-Tumors, oder anderer, nicht der Niere entstammender Tumor. Anwendungsgebiete der Erfindung sind die Medizin und die pharmazeutische Industrie. Der Erfindung liegt die Aufgabe zu Grunde, die bei dem heutigen Bearbeitungsstand dringend erforderlichen neuen Behandlungsformen und auch neue diagnostische Mittel für Nierenzellkarzinome bereitzustellen. Überraschenderweise wurde gefunden, dass das NBK-Protein, das im normalen Nierengewebe hoch exprimiert ist, im Tumorgewebe überhaupt nicht oder nur sehr schwach exprimiert ist. Die Proteinexpression und der Verlust von NBK wurde bei 80 Nierenzellkarzinom-Proben mittels Immunhistochemie und Mutationsanalytik untersucht. Das erfindungsgemässe Verfahren zur Diagnose ist dadurch gekennzeichnet, dass die NBK-Protein-Konzentration bzw. die NBK-RNA-Menge im Geweb bestimmt wird. Das erfindungsgemässe Mittel zur Therapie des Nierenzellkarzinoms und anderer Nierentumore ist dadurch gekennzeichnet, dass es die NBK-Proteinkonzentration in Nierenzellen oder anderen Geweben erhöht und in diesen Zellen direkt den therapeutischen Effekt auslöst.



WO 02/096468 A2

## **Methode zur Diagnose und Therapie des Nierenzellkarzinoms**

### **Beschreibung**

Die Erfindung betrifft ein neues Mittel zur Diagnose und Therapie des Nierenzellkarzinoms, sowie anderer Nierentumore, beispielsweise des Wilms-Tumors, oder anderer, nicht der Niere entstammender Tumore. Anwendungsgebiete der Erfindung sind die Medizin und die pharmazeutische Industrie.

Die operative Entfernung ist die bisher einzige Behandlungsmethode zur Heilung des nicht-metastasierten Nierenzellkarzinoms. Standardverfahren ist die radikale Tumor-Nephrektomie mit Entfernung der regionären Lymphknoten. Die 5-Jahres-Überlebensrate organbegrenzter Nierenzellkarzinome nach radikaler Tumornephrektomie beträgt, abhängig vom lokalen Tumorstadium 67-92%.

Die Prognose des metastasierten (N1 und höher, M1-Stadien nach der TNM-Klassifikation) ist wesentlich schlechter. Die mittlere Überlebenszeit bei Vorhandensein von Fernmetastasen beträgt etwa ein halbes Jahr nach Diagnosestellung, die 1-Jahres-Überlebensrate 28%. Eine Heilung des metastasierten Nierenzellkarzinoms durch Chemo-, Strahlen-, oder Hormontherapie ist nicht möglich. Im Vergleich zu anderen Tumoren ist das Nierenzellkarzinom extrem therapieresistent und spricht schlecht auf die genannten Therapien an, was die schlechte Prognose der Patienten mit dieser Erkrankung erklärt. Begrenzte Therapieerfolge wurden mit Immuntherapien mit Interleukin-2 oder Interferonen erzielt (Komplette plus partielle Remissionen bei 10 bis 30% der Patienten). Aber auch diese Behandlungen können das Überleben der Patienten nicht wesentlich verlängern (Ostendorf und Seeber, Hämatologie und Onkologie, Urban und Schwarzenberg 1997).

Neue Behandlungsformen und auch neue diagnostische Mittel sind also dringend erforderlich.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zu Grunde, die bei dem heutigen Bearbeitungsstand dringend erforderlichen neuen Behandlungsformen und auch neue diagnostische Mittel für Nierenzellkarzinome bereitzustellen.

Gründe für die extreme Therapieresistenz des Nierenzellkarzinoms sind bisher nicht bekannt. Um dies zu untersuchen, wurde eine Reihe von Genen geprüft, für die bereits in der Vergangenheit ein Einfluß auf die Prognose anderer Tumorerkrankungen gezeigt worden ist. Rein willkürlich wurde zusätzlich auch das Gen und Protein NBK ausgewählt, für das eine solche prognostische Bedeutung noch nicht bekannt war.

Überraschenderweise wurde gefunden, daß das NBK-Protein, das im normalen Nierengewebe hoch exprimiert ist (Daniel et al, 1999 und Abbildung 1), im Tumorgewebe überhaupt nicht oder nur sehr schwach exprimiert ist (Abbildung 1). Die Proteinexpression und der Verlust von NBK wurde bei 80 Nierenzellkarzinom-Proben mittels Immunhistochemie (vgl. Abb. 1) und Mutationsanalytik (s.u.) untersucht.

Der Verlust dieses Zelltod-regulierenden Proteins in Nierenzellkarzinomen ist offensichtlich für die Resistenz von Nierenzellkarzinomen verantwortlich.

Um den Grund für den Expressionsverlust zu erforschen, wurden detaillierte Mutationsanalyse-Methoden angewandt. Die bekannten 5 Exons des NBK-Gens auf Chromsom 22q13 (Verma et al. 2000) wurden mittels SSCP-PCR in DNA-Proben der o.g. Patienten mit Nierenzellkarzinom untersucht. Bei 10 Patienten zeigte sich eine auffällige Bande in der konformationsspezifischen PCR-Analyse. Diese auffälligen Proben (und zur Kontrolle auch mehrere Patienten ohne Auffälligkeiten in der SSCP-PCR) wurden mittels Sequenzierung der PCR-Produkte auf Veränderungen der genomischen DNA-Sequenz untersucht. Hierbei fanden sich, im Gegensatz zu früheren Untersuchungen bei kolorektalen Karzinomen (Abdel-Rahman et al. 2000), Punktmutationen. Weiterhin wurden genetische Veränderungen in intronischen Sequenzen gefunden, die das Spleißen der mRNA und die Expression des NBK-Proteins hemmen können.

Um die biologische Bedeutung des NBK-Verlusts zu untersuchen und auch um eine mögliche Therapie im Sinne einer Genkomplementierung zu untersuchen, wurde ein adenoviraler Vektor für den Gentransfer des Wildtyp NBK Gens konstruiert. Hierbei traten erhebliche Schwierigkeiten auf, da die Vektor-produzierenden Zellen (293-Zellen; humane embryonale Nierenzell-Linie) bei Transfektion mit den Konstrukten für konstitutive NBK-Expression starben und trotz intensiver Bemühungen mittels dieser konventionellen Methode keine Viren hergestellt werden konnten.

Aus diesem Grund wurde eine technische Entwicklung erforderlich, die das Ziel hatte, einen Gentransfer und eine konditionalen Expression zu ermöglichen. Dies bedeutet, daß Viren konstruiert werden mußten, die während der Vektorherstellung NBK nicht exprimieren, also abgeschaltet sind, um die Produktion der Viren überhaupt erst zu ermöglichen. Weiterhin ermöglicht ein solches konditionales Expressionssystem nach viralen Gentransfer auch einen an- und abschaltbaren Expression, also eine bessere Kontrolle des therapeutischen Transgens. Zu diesem Zweck wurde das Tet-off System in die E1- und die E3-Region eines adenoviralen Vektorsystems kloniert (s.u.).

Der Gentransfer von NBK in eine Auswahl von Nierenzellkarzinomlinien (Caki2, RCC-FG1, RCC-HS, RCC-KP, RCC-LR, RCC-MF, RCC-26) zeigte einen weiteren überraschenden Befund: diese Zellen starben rasch infolge der Aktivierung von Apoptose. Dies ist im Gegensatz zu früheren Befunden in T-Zellymphomzellen (Daniel et al. 1999) und anderen Zelllinien (Daniel et al., unveröffentlichte Ergebnisse), in denen die konstitutive hohe Überexpression des NBK-Gens die Zellen für Apoptose sensibilisierte, aber nicht per se Zelltod auslöste. In Kontroll-Experimenten mit Tumorzelllinien anderer Karzinome, in deren normalen Gegenstücken auch NBK-Expression nachgewiesen werden konnte (Verma et al. 2000), und zwar Tumorzellen des Gastrointestinaltrakts, Brustkrebs und Prostata, löste der adenovirale NBK-Gentransfer ebenfalls Apoptose aus, so daß der NBK-Gentransfer bzw. Aktivierung der NBK Genexpression ein breit anwendbares neues Therapieprinzip zur Abtötung von Tumorzellen darstellt.

Die Erfindung wird gemäß den Ansprüchen 1, 3 und 12 realisiert, die Unteransprüche sind Vorzugsvarianten.

Die Erfindung soll durch die folgenden Ausführungsbeispiele näher erläutert werden.

## Abkürzungen

$P_{CMV}$ :	kompletter „immediate early“ Promoter aus Cytomegalovirus, vermittelt effiziente Expression (Anderson et. al 1989)
$P_{miniCMV}$ :	minimaler „immediate early“ Promoter aus Cytomegalovirus. Dieser Promotor besitzt nicht den starken CMV Enhancer und ist daher ohne die Bindung von tTA an das TRE-Element nicht aktiv
$P_{hCMC*}$ :	Kombinierter Promotor, das TRE-Element ist direkt vor dem $P_{miniCMV}$ lokalisiert
TRE	Tetracyclin-Responsive Element, eine regulatorische Sequenz bestehend aus sieben Kopien des tet-Operators (42-bp, cis-regulatorische DNA Sequenz aus dem bakteriellen tet-Operon, die der Bindungsstelle des Tet-Repressors entspricht)
tTA:	Tetracycline-controlled transaktivator, ein Fusionsprotein bestehend aus dem TetR und der VP16 AD (Aktivierungsdomäne des Herpes Simplex Proteins VP16)
BGHpolyA:	Bovine growth hormone polyadenylation signal (Goodwin and Rottman, 1992)
Amp <sup>r</sup>	Ampicillin resistance Gen ( $\beta$ -Lactamase)
ColE1ori:	High-copy number origin of replication für E.coli

## Konstruktion des konditionalen adenoviralen Vektorsystems zur regulierbaren Überexpression von mycNBK

Zur regulierbaren Expression des proapoptotischen Gens NBK in humanen Zellen mittels eines adenoviralen Vektorsystems wurde ein rekombinanter Adenovirus basierend auf dem Ad5 Genom hergestellt, bei dem die E3 Region durch eine Expressionskassette für tTA (Tetracycline-controlled transaktivator) und die E1 Region durch eine Expressionskassette für mycNBK ersetzt wurde. Konstitutive Expression des tTA wird durch den CMV-Promotor gewährleistet. Bei Abwesenheit von Tetracyclin bzw Doxycyclin bindet das tTA Fusionsprotein über den Tet-Repressoranteil spezifisch an das Tet-Responsive Element (TRE) des Promotors  $P_{hCMV*1}$  und aktiviert über den VP16AD Anteil (Herpes simplex virus VP16 protein activation domain) die Transkription von mycNBK.

## Ausgangsplasmide zur Konstruktion von Adenoviren

### *pAd1-Del-E1/E3*

pAd1-Del-E1/E3 enthält ein Adenovirus 5 Genom, in dem sowohl die E3 als auch die E1 Region deletiert wurden (siehe Abb. 2) Die E3 Deletion entspricht der von Bett et al. (1994) beschriebenen Deletion aus BHG10 und erstreckt sich von 78.3 bis 85.8 mu. Konstruiert durch homologe Rekombination in *E. coli*: Die PacI Schnittstelle von BHG10 wurde aufgefüllt und ein 8.7 kb HapI-NotI Fragment mit pTG3602 rekombiniert (Chartier et al., 1996). Die E1 Deletion erstreckt sich von 0,9-9.8 mu und wurde durch homologe Rekombination des 2,7 kb PacI-NotI Fragments aus pHVAd2 in pAd1 (ClaI linearisiert) eingeführt (siehe auch pHVAd2).

### *pHVAd2*

Das Left-end shuttle Plasmid pAd2 dient zur Insertion von Genen in die E1-Region. Es enthält 2,6 kb des linken Endes des Adenovirus 5 mit einer 3,2 kb großen Deletion in der E1 Region. Diese größtmögliche E1 Deletion und die an dieser Stelle enthaltene Polycloning Region entsprechen der von Bett et. al (1994) für pΔE1sp1A beschriebenen Deletion.

### *pHVAd3*

Das shuttle Plasmid pAd3 dient zur Insertion von Genen in die E3-Region. Es enthält ein 4,6 kb großes BglII Fragment aus BHG10 (Bett et. al 1994). Dies entspricht 2,9 kb stromabwärts und 1,7 kb stromaufwärts Sequenzen der von Bett et. al beschriebenen E3-Deletion.

## Konstruktion von pAD-TreNBK-tTA

Zur Konstruktion von pAD-TreNBK-tTA wurde zuerst der Tetracyclin-regulierbare Promotor  $P_{hCMV*1}$  als XhoI EcoRI Fragment (aus pTre, Clontech) in die entsprechenden Schnittstellen von pHVAd2 kloniert. Anschließend wurde in die HindIII und SalI Schnittstelle eine, am 5'Ende mit einem für einen myc-Tag codierenden ORF fusionierte, NBK-cDNA einschließlich des BGH polyA-Signals (aus pcDNA3, Invitrogene) integriert (s. Abb. 2).

Die so entstandene NBK-Expressionskassette ( $P_{hCMV*1}$ ; mycNBK; BGH polyA) wurde mit den flankierenden adenoviralen DNA Sequenzen als PacI NotI Fragment isoliert und durch homologe Rekombination in den mit ClaI linearisierten pAd-DelE1/E3 eingefügt (s. Abb. 2). Um die Expressionskassette für den Tetracyclin-controlled-transactivator tTA in das so entstandene Plasmid pAd-TreNBK zu integrieren, wurde zuerst das entsprechende DNA Fragment, welches den  $P_{CMV}$ -Promotor, den Leserahmen für den tTA und ein SV40polyA-

Signal umfasst, als XhoI - PvuII Fragment aus dem Plasmid pTet-Off (Clontech) isoliert und in die SalI und NruI Schnittstelle des Shuttleplasmids pHVAd3 kloniert (Abb.3).

Aus dem resultierenden Plasmid pAd3-tTA wurde die tTA Expressionskassette mit 5' und 3' flankierenden Ad5-Sequenzen als NheI - StuI Fragment herausgeschnitten und durch homologe Rekombination in das Plasmid pAd1-TreNBK integriert (Abb. 3)

Das so entstandene Plasmid pAD-TreNBK-tTA enthält somit ein vollständiges Ad5 Genom in dem die E1 Region durch die NBK-Expressionskassette und die E3 Region durch die tTA-Expressionskassette ersetzt sind (Abb. 4). Das rekombinante Ad5 Genom lässt sich durch Spaltung mit PacI aus dem Plasmid ausschneiden und zur Transfektion von 293-Zellen verwenden in denen dann die Produktion der rekombinanten Adenoviren erfolgt.

### **Überexpression von mycNBK in Abhängigkeit von der Dox Konzentration**

Infektion von humanen Zelllinien mit dem rekombinanten Adenovirus Ad-TreNBK-tTA (Abb. 5A) induziert eine starke Überexpression von mycNBK in Abhängigkeit von der Dox Konzentration. Abbildung 4B zeigt die Überexpression von mycNBK in DU145 Zellen 24 Stunden nach Infektion mit 25 MOI Ad-mycNBK-tTA. In Abwesenheit von Dox erfolgt eine starke Expression, die mit zunehmender Dox Konzentration abnimmt. Bei Konzentrationen über 10 ng/ml ist die mycNBK Expression fast vollständig reprimiert (Abb 5B).

Bei Abwesenheit von Dox bzw. Tetracyclin konnte auch bei einer Reihe von weiteren Zelllinien eine starke Überexpression von mycNBK 24 Stunden nach Infektion mit Ad-TreNBK-tTA festgestellt werden (s.u.).

### **Induktion von Apoptose durch Ad-TreNBK-tTA vermittelte Überexpression von mycNBK**

Die Induktion von Apoptose durch adenoviral vermittelte Überexpression von mycNBK wurde bei Nierenzellkarzinomzellen und anderen Tumorzelllinien untersucht.

Die Westernblot Analyse zeigt bei Abwesenheit von Dox eine starke Überexpression von mycNBK in den entsprechenden Zelllinien 24 Stunden nach Infektion mit Ad-TreNBK-tTA (Abb.6A). Die modifizierte Zellzyklus zeigt darüber hinaus bei den mycNBK exprimierenden Zellen einen starken Anstieg der Sub-G1 Fraktion, welche die apoptotischen Zellen repräsentiert (Abb.6B). Überexpression von mycNBK führt somit zur Induktion von Apoptose in den untersuchten Nierenkarzinom- und anderen Zelllinien. Neben den in Abb 5 gezeigten Zelllinien wurde die Induktion der Apoptose in weiteren Nierenkarzinom-Zelllinien (RCC-LR, RCC-FG1, RCC-MF, RCC-26 Caki2), Osteosarkomzelllinien (U2OS, Saos2), Melanomzelllinien (Mel-2A, MeWo) und in Mammakarzinomzelllinie (MatuADR) untersucht.

Infektion mit Ad-TreNBK-tTA führte auch bei diesen Zelllinien bei Abwesenheit von Dox zur Überexpression von mycNBK und zur Induktion von Apoptose.

### **Rolle des endogenen NBK in NBK-exprimierenden Geweben**

Da NBK ein Apoptose-förderndes, Gewebe-spezifisches Zelltod-förderndes Gen ist, wird aufgrund der oben geschilderten Befunde geschlossen, daß es eine physiologische Rolle beim Gewebsuntergang von Nierengewebe und -zellen ausüben kann. Die Überaktivität solcher Zelltodgene kann theoretisch, wie auch für andere Gene gezeigt, Gewebsuntergang und pathologische Zustände wie Nierengewebsdegeneration auslösen. Solche Phänomene sind beteiligt an erblichen, somatischen und durch exogene Schädigung, z.B. durch Toxine und Schwermetalle oder Immunreaktionen wie der infektiösen und nicht-infektiösen Nephritis oder Transplantatabstoßung ausgelöste Nierenschädigungen.

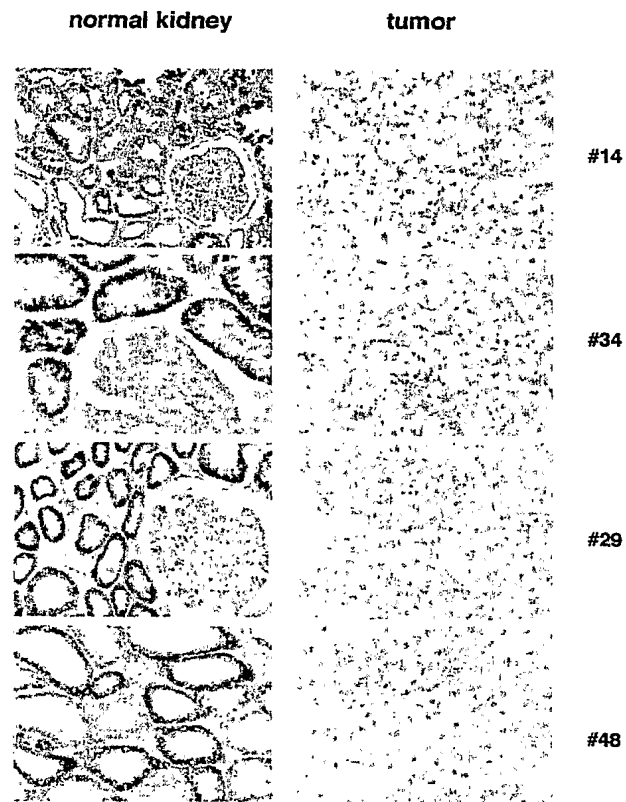
Basierend auf dieser Hypothese wird eine weitere Anwendungsmöglichkeit der Erfindung vorgeschlagen, mit der die Wirkung von NBK gehemmt wird, beispielsweise durch Hemmung des Moleküls selbst, seiner Wirkung in der nachgeschalteten Signalkette oder Herunterregulation des Signal-Moleküls selbst. Eine weitere Einsatzmöglichkeit der erfindungsgemäßen Erkenntnis besteht darin, in bestimmten Fällen von erblichen oder somatischen Nierenerkrankungen oder Nierengewebsdegeneration ausgelöst durch andere Ursachen, den Spiegel an NBK-Protein oder NBK-RNA zu senken. Dies stellt ein neuartiges Therapieprinzip für Nierenerkrankungen dar.



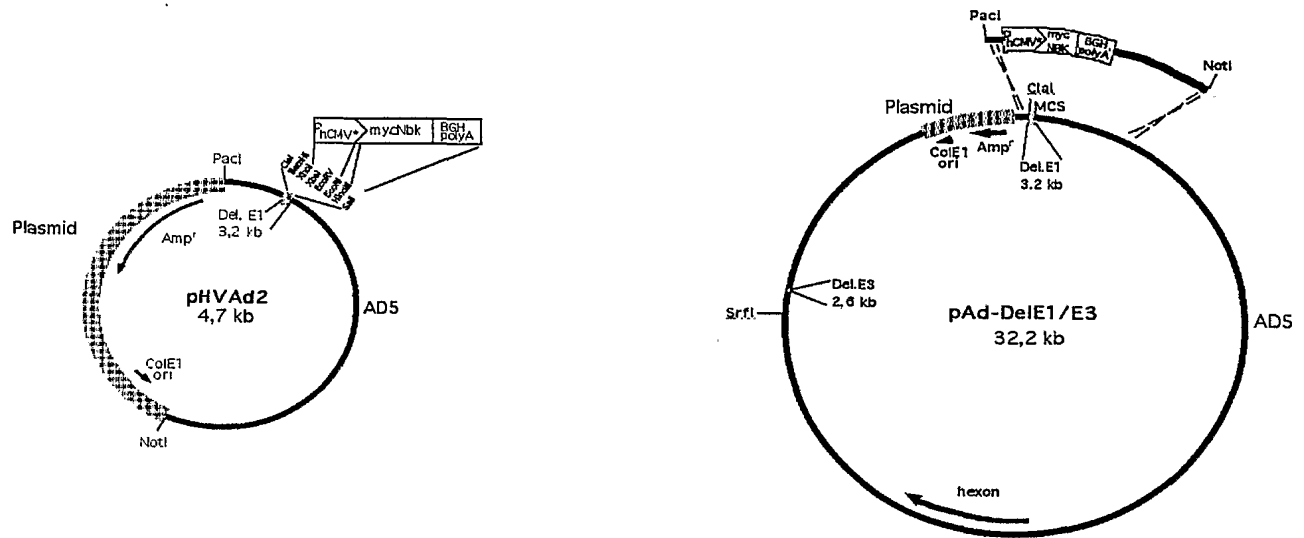
### **Patentansprüche:**

1. Verfahren zur Diagnose des Nierenzellkarzinoms, anderer Nierentumore, beispielsweise des Wilms-Tumors oder andere, nicht der Niere entstammender Tumore, dadurch gekennzeichnet, daß die NBK-Protein-Konzentration bzw. die NBK-RNA-Menge im Gewebe bestimmt wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß eine Analyse von Mutationen und Polymorphismen im NBK-Gen durchgeführt wird, bevorzugt durch DNA-Sequenz-Analyse und Messung veränderter NBK-mRNA- und NBK-Proteine.
3. Mittel zur Therapie des Nierenzellkarzinoms und anderer Nierentumore, beispielsweise des Wilms-Tumors, oder andere, nicht der Niere entstammender Tumore, dadurch gekennzeichnet, daß es die NBK-Proteinkonzentration in Nierenzellen oder anderen Geweben erhöht und in diesen Zellen direkt den therapeutischen Effekt auslöst.
4. Mittel nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß es die NBK-Proteinexpression durch Transfer von NBK-cDNA oder des NBK-Gens oder dessen Anteilen erhöht.
5. Mittel nach Anspruch 3 und 4, dadurch gekennzeichnet, daß es die NBK-Proteinexpression unter Verwendung viraler und nicht-viraler Expressionsvektoren erhöht.
6. Mittel nach Anspruch 3 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß es die NBK-Proteinexpression unter Verwendung eines konditionalen adenoviralen Expressionsvektors erhöht, bevorzugt mittels des in Abbildung 4 dargestellten Vektors, konstruiert durch Klonierung der Expressionskassette in pAD3 wie in Abbildung 3 dargestellt.
7. Mittel nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß es gewebespezifische Expression von NBK erzielt unter bevorzugter Verwendung gewebespezifischer Promotoren und anderer, beispielsweise hormoneller oder anderer pharmakologischer Regulatoren.
8. Mittel nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß es gewebespezifische Expression von NBK erzielt unter Konstruktion chimärer Moleküle, bestehend beispielsweise aus NBK und Transkriptionsfaktor-Anteilen oder Signalpeptiden auf der Ebene des NBK-Gens, der RNA oder des Proteins.
9. Mittel nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß herunterreguliertes endogenes NBK wieder zur Expression gebracht wird, beispielsweise mittels pharmakologischer Stimulation der NBK-Protein-Expression durch Aktivierung der Genexpression und aktivierender Regulation des NBK-Promotors.
10. Mittel nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß NBK-Proteinexpression erhöht wird durch Stabilisierung der NBK-Protein-Expression, beispielsweise durch Hemmung des NBK-Abbaus.

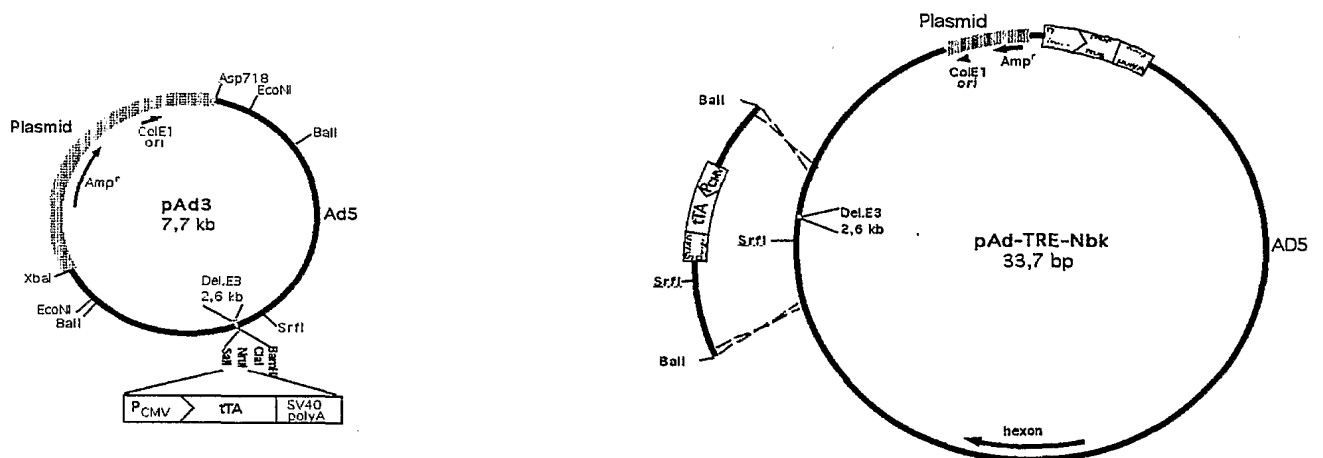
11. Mittel nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß NBK-Aktivität erhöht oder vermindert wird durch Aktivierung oder Hemmung regulatorischer Anteile des Proteins.
12. Mittel zur Therapie erblicher oder somatischer Nierenerkrankungen wie beispielsweise degenerativer Nierenerkrankungen, infektiöser und nichtinfektiöser entzündlicher oder toxischer Nierenschädigungen, in denen Zellen durch Apoptose absterben, gekennzeichnet dadurch, daß Hemmer der Expression oder der Aktivität des NBK-Proteins- oder der NBK-RNA in Nierenzellen eingebracht werden.
13. Mittel nach Anspruch 12 gekennzeichnet dadurch, daß die Aktivität des NBK-Proteins- oder der NBK-RNA vermindert wird durch Aktivierung oder Hemmung regulatorischer Anteile des NBK-Gens.
14. Mittel nach Anspruch 12 gekennzeichnet dadurch, daß die Aktivität des NBK-Proteins- oder der NBK-RNA vermindert wird durch Aktivierung oder Hemmung nachgeschalteter Signalwege.



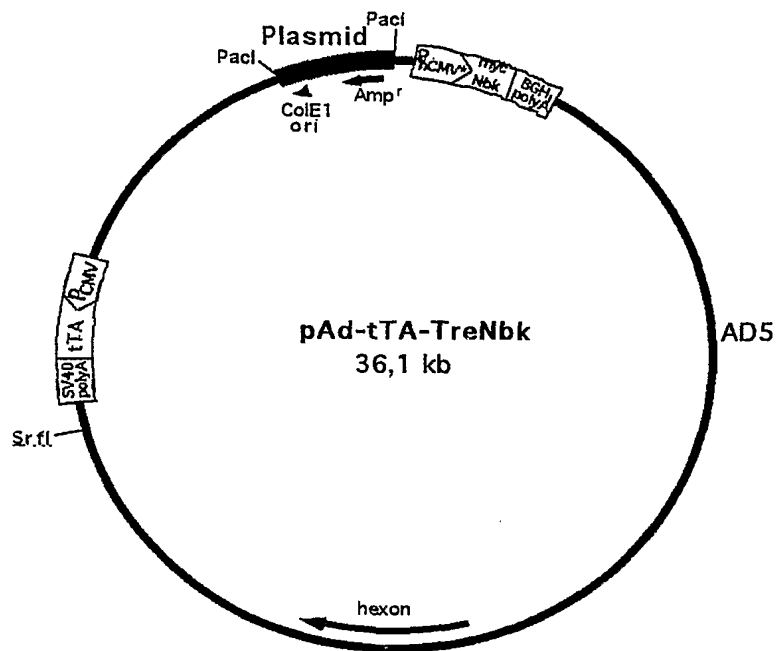
**Abb. 1:** Immunhistochemischer Protein-Nachweis von NBK in normalem Nierengewebe (linker Teil der Abbildung) und Tumorgewebe (rechter Teil der Abbildung) von 4 Patienten mit Nierenzellkarzinom. Im linken Bildteil ist deutlich die Färbung der tubulären Nierenepithelien und der das Glomerulum auskleidenden Nierenepithelien sichtbar. Im Tumor hingegen ist keine (Tumor #29) bzw. nur sehr schwache NBK-Expression nachweisbar (Tumorprobe #14, #34, #48).



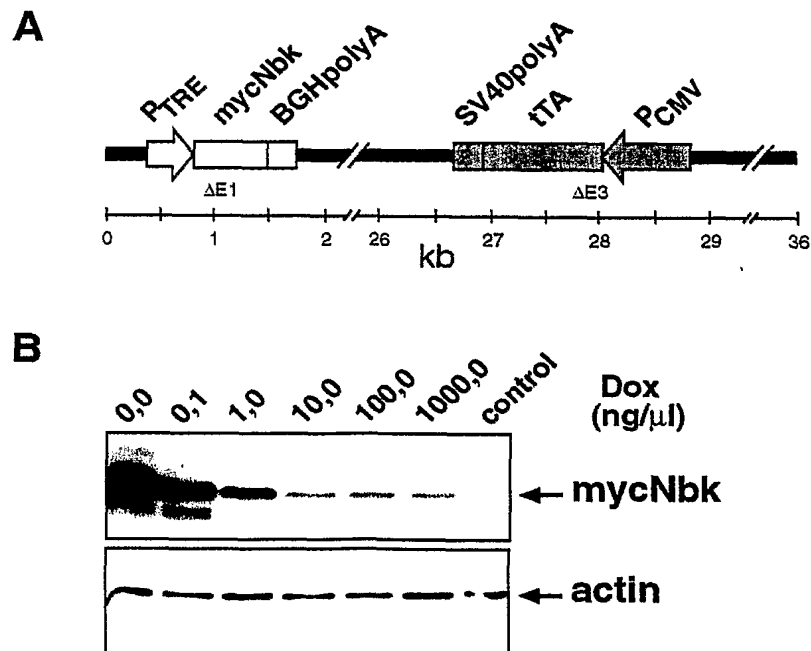
**Abb. 2:** Klonierung der mycNBK-Expressionskassette in pAd2 und Integration in pAD-DeIE1/E3 durch homologe Rekombination



**Abb. 3:** Klonierung der tTA-Expressionskassette in pAd3 und Integration in pAD-TreNBK durch homologe Rekombination



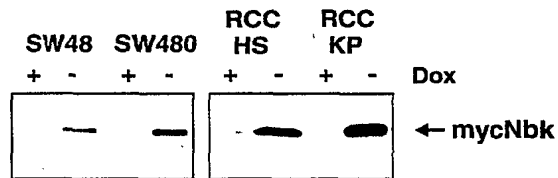
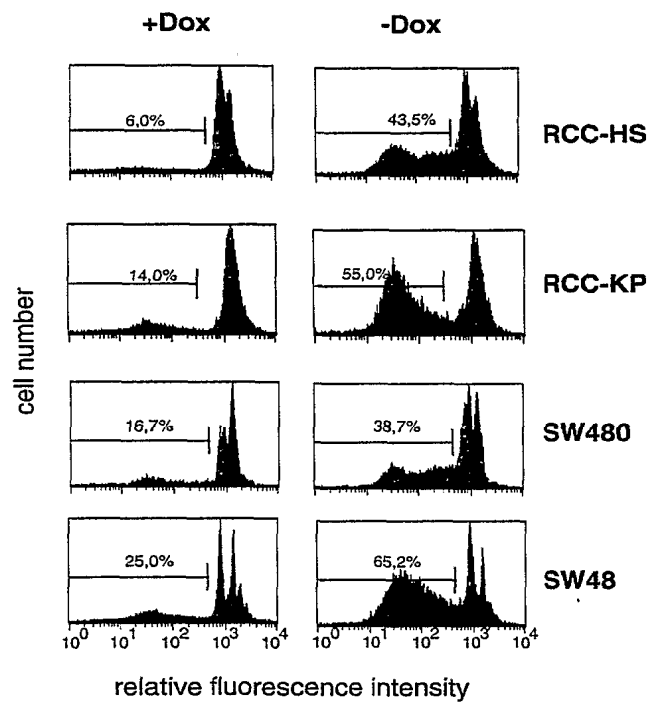
**Abb. 4:** pAD-TreNBK-tTA



**Abb. 5:** Induzierte mycNBK Expression durch Ad-TreNBK-tTA

A. genomische Struktur des rekombinanten Adenovirus Ad-TreNBK-tTA

B. Westernblot Analyse der mycNBK Expression in Abhängigkeit von der Dox Konzentration

**A****B**

**Abb. 6:** Apoptoseinduktion durch mycNBK Überexpression  
 A. Westernblot Analyse der mycNBK Überexpression  
 B. Modifizierte Zellzyklus Analyse

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
5. Dezember 2002 (05.12.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 02/096468 A3**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: **A61K 48/00**,  
A61P 13/12, G01N 33/53, 33/574, C12N 15/86

(71) Anmelder und

(72) Erfinder: **DANIEL, Peter** [DE/DE]; Treiberpfad 14,  
13469 Berlin (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE02/01999

(71) Anmelder und

(22) Internationales Anmeldedatum:  
30. Mai 2002 (30.05.2002)

(72) Erfinder (nur für US): **GILLISSEN, Bernhard** [DE/DE];  
Grossbeerenstr. 36, 10965 Berlin (DE).

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(74) Anwalt: **BAUMBACH, F.**; Robert-Rössle-Strasse 10,  
13125 Berlin (DE).

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

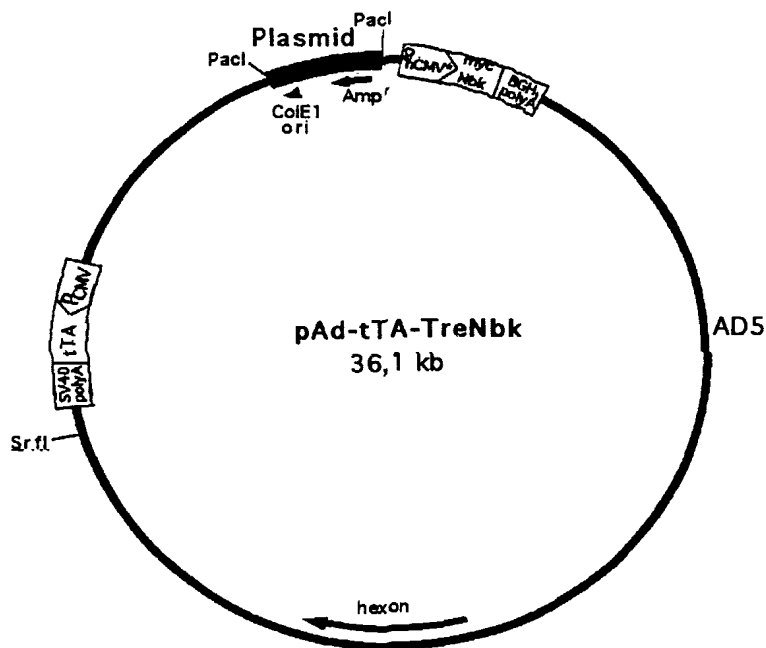
(30) Angaben zur Priorität:  
101 26 473.9 31. Mai 2001 (31.05.2001) DE

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD FOR THE DIAGNOSIS AND THERAPY OF RENAL CELL CARCINOMA

(54) Bezeichnung: METHODE ZUR DIAGNOSE UND THERAPIE DES NIERENZELLKARZINOMS



pAD-TreNBK-tTA

therapeutic effect in these cells.

(57) Abstract: The invention relates to a novel agent for the diagnosis and therapy of renal cell carcinoma and other renal tumors, for example, Wilms' tumor or other tumors not originating from the kidneys. The areas of applications of the invention include the field of medicine and the pharmaceutical industry. The aim of the invention is to provide novel forms of treatment, which are urgently required in the present-day processing state, as well as novel diagnostic agents for renal cell carcinoma. It was surprisingly discovered that the NBK protein, which is highly expressed in normal renal tissue, is not expressed at all or is only weakly expressed in the tumor tissue. The protein expression and the loss of NBK was examined in 80 renal cell carcinoma samples by using immunohistochemistry and mutation analysis. The inventive method for diagnosis is characterized in that the NBK protein concentration or the NBK-RNA quantity in the tissue is determined. The inventive agent for the therapy of the renal cell carcinoma and other renal tumors is characterized in that the NBK protein concentration in renal cell or in other tissues is increased and directly initiates the

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein neues Mittel zur Diagnose und Therapie des Nierenzellkarzinoms, sowie anderer Nierentumore, beispielsweise des Wilms-Tumors, oder anderer, nicht der Niere entstammender Tumor. Anwendungsgebiete der Erfindung sind die Medizin und die pharmazeutische Industrie. Der Erfindung liegt die Aufgabe zu Grunde, die bei dem heutigen Bearbeitungsstand dringend erforderlichen neuen Behandlungsformen und auch neue diagnostische Mittel für Nierenzellkarzinome bereitzustellen. Überraschenderweise wurde gefunden, dass das NBK-Protein, das im normalen Nierengewebe hoch exprimiert ist, im Tumorgewebe überhaupt nicht oder nur sehr schwach exprimiert ist. Die

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]



WO 02/096468 A3



CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Veröffentlicht:**

— mit internationalem Recherchenbericht

**(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen**

**Recherchenberichts:**

28. August 2003

**(84) Bestimmungsstaaten (regional):** ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.*

Proteinexpression und der Verlust von NBK wurde bei 80 Nierenzellkarzinom-Proben mittels Immunhistochemie und Mutationsanalytik untersucht. Das erfindungsgemäße Verfahren zur Diagnose ist dadurch gekennzeichnet, dass die NBK-Protein-Konzentration bzw. die NBK-RNA-Menge im Geweb bestimmt wird. Das erfindungsgemäße Mittel zur Therapie des Nierenzellkarzinoms und anderer Nierentumore ist dadurch gekennzeichnet, dass es die NBK-Proteinkonzentration in Nierenzellen oder anderen Geweben erhöht und in diesen Zellen direkt den therapeutischen Effekt auslöst.



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 02/01999

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K48/00 A61P13/12 G01N33/53 G01N33/574 C12N15/86

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

BIOSIS, EPO-Internal, WPI Data, PAJ, EMBASE

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>DANIEL P T ET AL: "Reversal of classical, P-glycoprotein-mediated and atypical drug resistance by overexpression of the apoptosis promoters bak and bik/nbk-1." ANNALS OF HEMATOLOGY, vol. 77, no. SUPPL. 2, 1998, page S38 XP009009185</p> <p>Annual Congress of the German and Austrian Societies of Hematology and Oncology; Frankfurt, Germany; October 25-28, 1998</p> <p>ISSN: 0939-5555</p> <p>the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-14

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

14 April 2003

Date of mailing of the international search report

08/05/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Thumb, W

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>DANIEL PETER T ET AL: "Expression of the death gene Bik/Nbk promotes sensitivity to drug-induced apoptosis in corticosteroid-resistant T-cell lymphoma and prevents tumor growth in severe combined immunodeficient mice."  BLOOD,  vol. 94, no. 3,  1 August 1999 (1999-08-01), pages  1100-1107, XP002238050  ISSN: 0006-4971  cited in the application  the whole document</p> <p>----</p>	1-14
A	<p>DANIEL P T ET AL: "Reversal of classical, P-glycoprotein-mediated drug resistance by overexpression of the apoptosis promoters bak and bik/nbk-1."  PROCEEDINGS OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH ANNUAL,  vol. 39, March 1998 (1998-03), page 599  XP001147805  89th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research; New Orleans, Louisiana, USA; March 28-April 1, 1998, March, 1998  ISSN: 0197-016X  the whole document</p> <p>----</p>	1-14
A	<p>HAN JEONGHOON ET AL: "Induction of apoptosis by human Nbk/Bik, a BH3-containing protein that interacts with E1B 19K."  MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY,  vol. 16, no. 10, 1996, pages 5857-5864,  XP002238051  ISSN: 0270-7306  the whole document</p> <p>----</p>	1-14
A	<p>VERMA S ET AL: "Structural analysis of the human pro-apoptotic gene Bik: Chromosomal localization, genomic organization and localization of promoter sequences"  GENE, ELSEVIER BIOMEDICAL PRESS.  AMSTERDAM, NL,  vol. 254, no. 1-2,  22 August 2000 (2000-08-22), pages  157-162, XP004208791  ISSN: 0378-1119  the whole document</p> <p>----</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-14

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 02/01999

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 00 15648 A (THE UAB RESEARCH FOUNDATION) 23 March 2000 (2000-03-23) page 3 -page 4 example 28	3-14
A	----- IMAI E ET AL: "TOWARDS GENE THERAPY FOR RENAL DISEASES" NEPHROLOGIE, EDITIONS MEDECINE ET HYGIENE, GENEVA, CH, vol. 19, no. 7, 1998, pages 397-402, XP009007604 ISSN: 0250-4960 the whole document -----	3-14

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 12-14  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
  
**see supplemental sheet PCT/ISA/210**
2. ☒ Claims Nos.: 3-5, 7-14  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
  
**see supplemental sheet PCT/ISA/210**
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

### Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## Continuation of I.1

Although Claims 12-14 relate to a therapeutic agent for kidney diseases, the wording of the claims also includes a reference to introducing inhibitors of Nbk activity. Said claims therefore appear to relate to a method for treatment of the human or animal body. Consequently, the search is based solely on the alleged effects of the agents described in the application.

-----

## Continuation of I.1

Claims: 12-14

PCT Rule 39.1(iv) – method for treatment of the human or animal body by therapy (Claims 12-14).

-----

## Continuation of I.2

Claims 3-5, 7-14

The current Claims 3 and 7-14 relate to an agent defined by a desirable characteristic or property, namely influencing Nbk expression or activity. The claims therefore encompass all products, etc., that have this characteristic or property, but the application provides support by the description (PCT Article 5) for only a limited number of such products, etc. In the present case the claims lack the proper support and the application lacks the requisite disclosure to such an extent that it appears impossible to carry out a meaningful search covering the entire range of protection sought. Moreover, the claims also lack the requisite clarity (PCT Article 6) since they attempt to define the product in terms of the desired result. This lack of

clarity too is such that it is impossible to carry out a meaningful search covering the entire scope of protection sought. Therefore, the search was directed to the parts of the claims that appear to be clear, supported or disclosed in the above sense, that is the parts concerning an adenoviral expression system for Nbk, as set forth in the examples on pages 4-7.

The applicant is advised that claims or parts of claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established normally cannot be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). In its capacity as International Preliminary Examining Authority the EPO generally will not carry out a preliminary examination for subjects that have not been searched. This also applies to cases where the claims were amended after receipt of the international search report (PCT Article 19) or where the applicant submits new claims in the course of the procedure under PCT Chapter II.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 02/01999

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0015648	A	23-03-2000	AU 5817299 A	03-04-2000
			WO 0015648 A1	23-03-2000
			US 2001010814 A1	02-08-2001
<hr/>				

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 A61K48/00 A61P13/12 G01N33/53 G01N33/574 C12N15/86

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 G01N C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

BIOSIS, EPO-Internal, WPI Data, PAJ, EMBASE

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	DANIEL P T ET AL: "Reversal of classical, P-glycoprotein-mediated and atypical drug resistance by overexpression of the apoptosis promoters bak and bik/nbk-1." ANNALS OF HEMATOLOGY, Bd. 77, Nr. SUPPL. 2, 1998, Seite S38 XP009009185 Annual Congress of the German and Austrian Societies of Hematology and Oncology; Frankfurt, Germany; October 25-28, 1998 ISSN: 0939-5555 das ganze Dokument --- -/--	1-14



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen -:

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*&amp;\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

14. April 2003

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

08/05/2003

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Thumb, W



## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>DANIEL PETER T ET AL: "Expression of the death gene Bik/Nbk promotes sensitivity to drug-induced apoptosis in corticosteroid-resistant T-cell lymphoma and prevents tumor growth in severe combined immunodeficient mice."  BLOOD,  Bd. 94, Nr. 3,  1. August 1999 (1999-08-01), Seiten 1100-1107, XP002238050  ISSN: 0006-4971  in der Anmeldung erwähnt  das ganze Dokument</p> <p>---</p>	1-14
A	<p>DANIEL P T ET AL: "Reversal of classical, P-glycoprotein-mediated drug resistance by overexpression of the apoptosis promoters bak and bik/nbk-1."  PROCEEDINGS OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH ANNUAL,  Bd. 39, März 1998 (1998-03), Seite 599  XP001147805  89th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research; New Orleans, Louisiana, USA; March 28-April 1, 1998, March, 1998  ISSN: 0197-016X  das ganze Dokument</p> <p>---</p>	1-14
A	<p>HAN JEONGHOON ET AL: "Induction of apoptosis by human Nbk/Bik, a BH3-containing protein that interacts with E1B 19K."  MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY,  Bd. 16, Nr. 10, 1996, Seiten 5857-5864,  XP002238051  ISSN: 0270-7306  das ganze Dokument</p> <p>---</p>	1-14
A	<p>VERMA S ET AL: "Structural analysis of the human pro-apoptotic gene Bik: Chromosomal localization, genomic organization and localization of promoter sequences"  GENE, ELSEVIER BIOMEDICAL PRESS.  AMSTERDAM, NL,  Bd. 254, Nr. 1-2,  22. August 2000 (2000-08-22), Seiten 157-162, XP004208791  ISSN: 0378-1119  das ganze Dokument</p> <p>---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-14

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 00 15648 A (THE UAB RESEARCH FOUNDATION) 23. März 2000 (2000-03-23) Seite 3 -Seite 4 Beispiel 28 -----	3-14
A	IMAI E ET AL: "TOWARDS GENE THERAPY FOR RENAL DISEASES" NEPHROLOGIE, EDITIONS MEDECINE ET HYGIENE, GENEVA, CH, Bd. 19, Nr. 7, 1998, Seiten 397-402, XP009007604 ISSN: 0250-4960 das ganze Dokument -----	3-14

**Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)**

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr. 12-14  
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich  
siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
2. ☒ Ansprüche Nr. 3-5, 7-14  
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen,  
daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich  
siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
3. ☐ Ansprüche Nr.  
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

**Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)**

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

**Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs**

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

## WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

## Fortsetzung von Feld I.1

Obwohl die Ansprüche 12-14 auf ein Mittel zur Therapie von Nierenerkrankungen beziehen, findet sich im Wortlaut der Ansprüche auch ein Hinweis auf die Einbringung von Hemmern der NBK Aktivität. Daher scheinen sich besagte Ansprüche auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers zu beziehen. Die Recherche gründet sich daher nur auf die angegebenen Wirkungen der in der Anmeldung beschriebenen Mittel.

## Fortsetzung von Feld I.1

Ansprüche Nr.: 12-14

Regel 39.1(iv) PCT – Verfahren zur therapeutischen Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers (Ansprüche 12-14)

## Fortsetzung von Feld I.2

Ansprüche Nr.: 3-5, 7-14

Die geltenden Patentansprüche 3 und 7-14 beziehen sich auf ein Mittel, jeweils charakterisiert durch eine erstrebenswerte Eigenheit oder Eigenschaft, nämlich die Beeinflussung der NBK Expression/Aktivität. Die Patentansprüche umfassen daher alle Produkte etc., die diese Eigenheit oder Eigenschaft aufweisen, wohingegen die Patentanmeldung Stütze durch die Beschreibung im Sinne von Art. 5 PCT nur für eine begrenzte Zahl solcher Produkte etc. liefert. Im vorliegenden Fall fehlen den Patentansprüchen die entsprechende Stütze bzw. der Patentanmeldung die nötige Offenbarung in einem solchen Maße, daß eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich erscheint. Desungeachtet fehlt den Patentansprüchen auch die in Art. 6 PCT geforderte Klarheit, nachdem in ihnen versucht wird, das Produkt über das jeweils erstrebte Ergebnis zu definieren. Auch dieser Mangel an Klarheit ist dergestalt, daß er eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich macht. Daher wurde die Recherche auf die Teile der Patentansprüche gerichtet, welche im o.a. Sinne als klar, gestützt oder offenbart erscheinen, nämlich die Teile betreffend ein adenovirales Expressionssystem für NBK, wie in den Beispielen auf Seite 4-7 erläutert.

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt.

**WEITERE ANGABEN****PCT/ISA/ 210**

Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentansprüche vorlegt.

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung

zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 02/01999

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 0015648	A	23-03-2000	AU	5817299 A	03-04-2000
			WO	0015648 A1	23-03-2000
			US	2001010814 A1	02-08-2001
-----					